

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu dan Teknologi Pangan Universitas Muhammadiyah Malang, Malang. Penelitian berlangsung selama 3 bulan mulai bulan April sampai bulan Juli 2019.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam proses pembuatan ekstrak simplisia terung antara lain spatula, batang pengaduk, labu ukur, timbangan analitik merk Ohaus Pioneer PA413, *rotary evaporator* merk Heidolph Laborota 4001 WB, erlenmeyer, *beaker glass*, kertas saring Whatman no. 41, *vacuum pump* merk vacuubrand ME 2C, *vacuum filter flask*, corong Buchner, botol kaca gelap, *showcase*, aluminium foil, pisau, loyang, blender, corong, gelas ukur, *baker glass*, dan gelas ukur.

Alat-alat yang digunakan dalam proses analisis adalah erlenmeyer, seperangkat alat kaca (*glassware IWAKI PYREX*), botol vial, sentrifuse merk Caliesys PLC Series, timbangan analitik merk Ohaus Pioneer PA413, spatula, kurs porselen, batang pengaduk, rak tabung reaksi, *baker glass*, gelas ukur, pipet, *fortex*, oven merk WTC Binder type E53-89749, pH meter tipe Lab 875 (*SI Analytics*), desikator *Glaswerk Wertheim 6132*, *spektrofotometer UV Visible* tipe UV-1800 (SHIMADZU), *spektrofotometer thermo spectronic* (GENESYS 20), *waterbath*, dan lemari asam.

### 3.2.2 Bahan

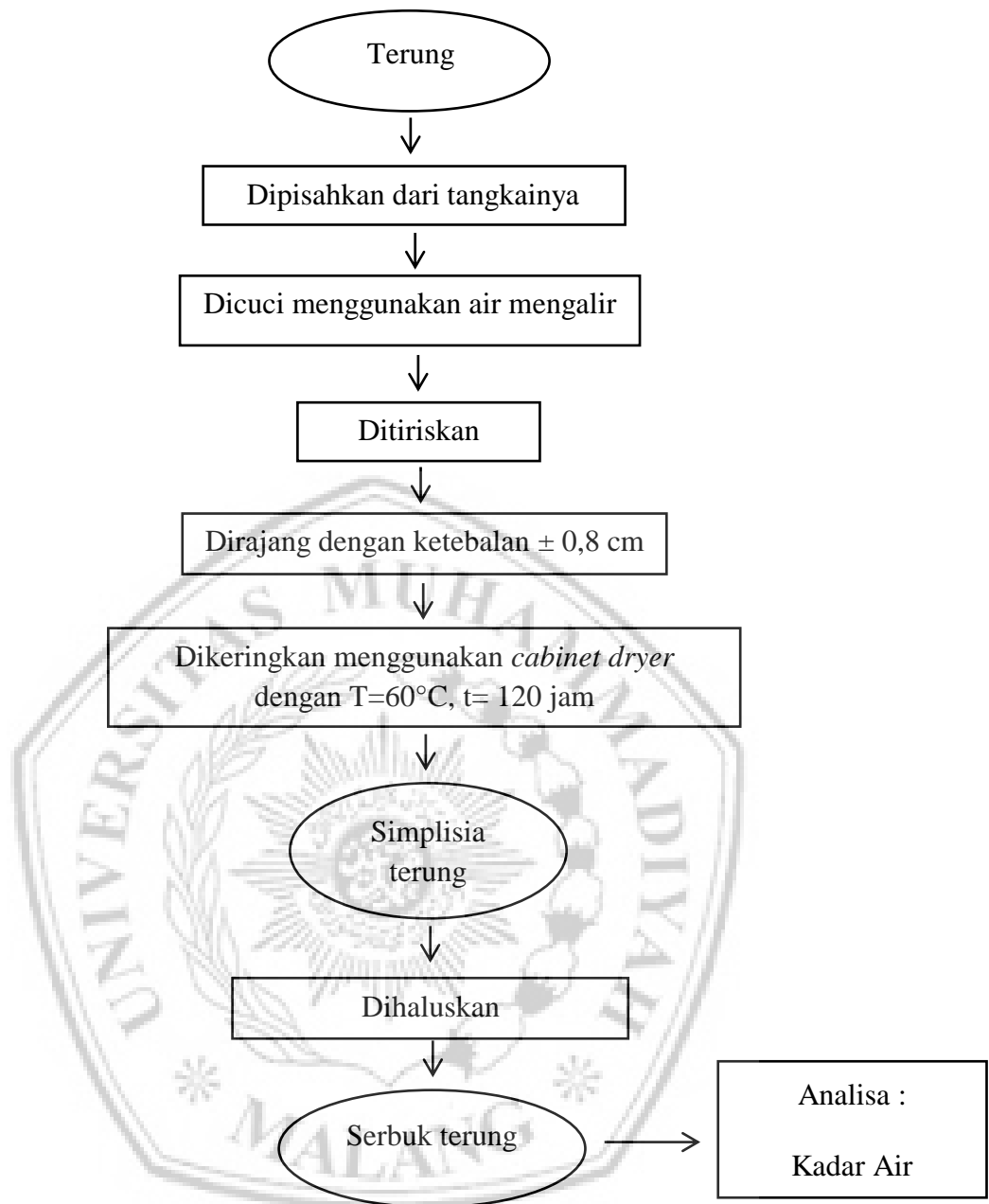
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah terung ungu dan terung hijau yang cukup umur panen (55 hari) dengan panjang rata-rata 25 – 30 cm yang di dapat dari Pasar Karangploso, Malang. Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk proses analisis diperoleh dari Laboratorium Ilmu dan Teknologi Pangan UMM antara lain adalah aquades, etanol 96% , etanol 96% *p.a.*, n-heksana, etil asetat, reagen Folin-Ciocalteu, asam galat, kuersetin, DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) 0,25 mM,  $\text{AlCl}_3$  10%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5%,  $\text{NaNO}_3$  5%, NaOH 1M, BSA (*Bovine Serum Albumin*) 1%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , dan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

### 3.3 Prosedur Kerja

Penelitian ini dimulai dengan pembuatan simplisia terung ungu dan terung hijau dilanjutkan ekstraksi dengan metode maserasi, dimana masing-masing terung akan di ekstraksi menggunakan 3 jenis pelarut yaitu etanol 96%, etil asetat dan n-heksana. Kemudian dilakukan analisis kadar air, rendemen, total flavonoid dan total fenol serta aktivitas antioksidan dan antiinflamasi secara *in vitro*.

#### 3.3.1 Pembuatan Serbuk Terung (Suharto, 2005)

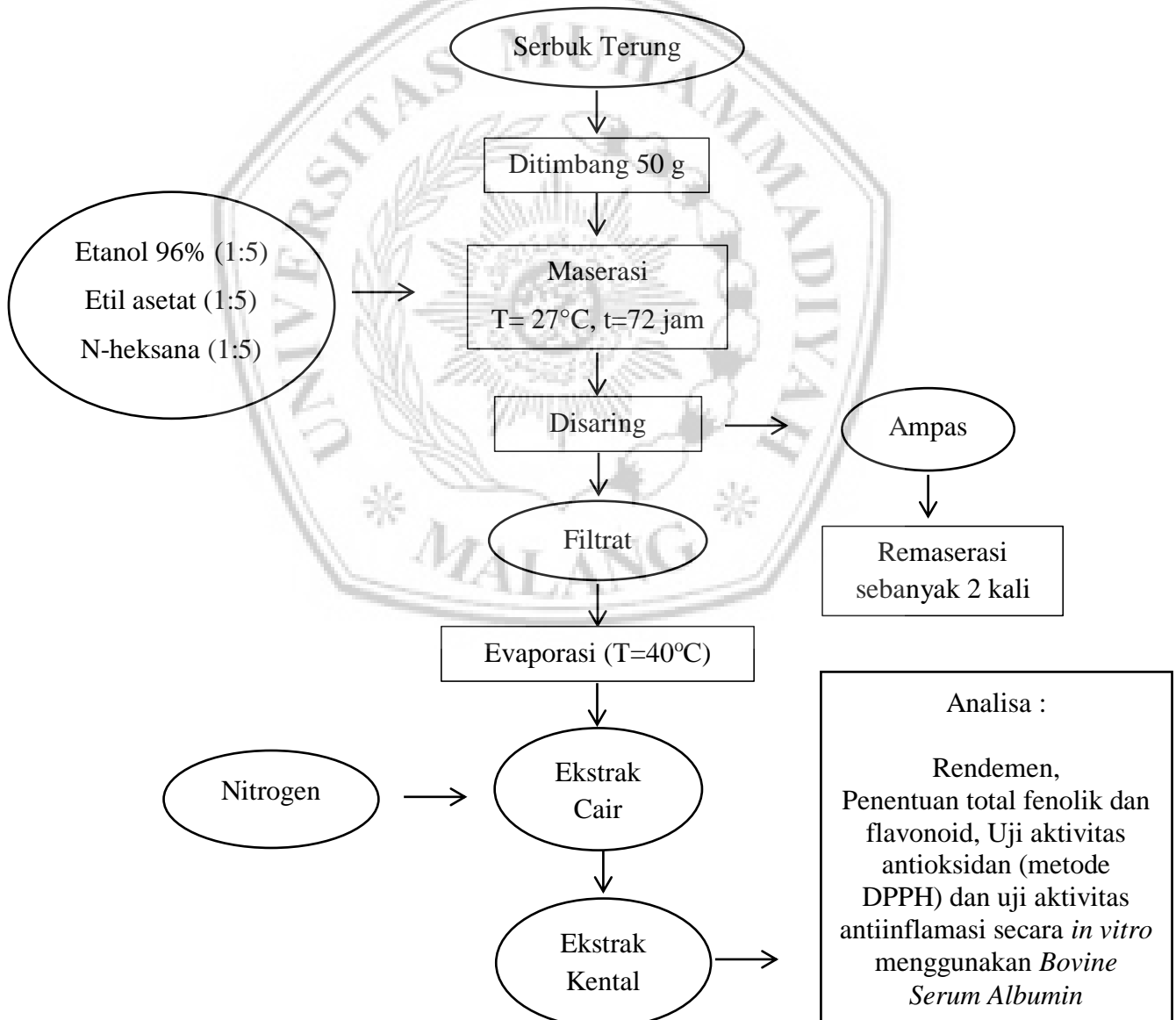
Buah terung ungu dan terung hijau yang telah dikumpulkan, dipisahkan dari tangkainya. Dicuci hingga bersih lalu ditiriskan dan dirajang dengan ketebalan  $\pm$  0,8 cm. Buah terung yang telah dirajang kemudian dikeringkan menggunakan *cabinet dryer* selama 120 jam lalu dihaluskan menggunakan blender.



**Gambar 8.** Diagram Alir Pembuatan Bubuk Terung

### 3.3.2 Ekstraksi Simplisia Terung (Prasetio dan Inoriah, 2013)

Sampel yang telah dijadikan serbuk ditimbang sebanyak 50 g, dimaserasi selama 72 jam dengan penambahan 250 ml pelarut (etanol 96%, etil asetat dan n-heksana). Metode maserasi yang digunakan yaitu remaserasi, dimana ampas sisa maserasi pertama dimaserasi kembali sebanyak 2 kali. Setelah itu sampel disaring menggunakan kertas saring Whattman. Filtrat yang didapatkan diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C dan menghasilkan ekstrak cair. Ekstrak cair dialiri dengan nitrogen hingga didapatkan ekstrak kental.



**Gambar 9.** Diagram Alir Ekstraksi Simplisia Terung

### **3.4 Prosedur Analisa**

#### **3.4.1 Analisis Rendemen (AOAC, 2005)**

Perhitungan rendemen ini dilakukan dengan membandingkan berat bahan baku dengan berat hasil produk, berikut ini merupakan prosedur kerjanya :

1. Berat bahan baku terung ditimbang.
2. Berat hasil akhir ditimbang.
3. Rendemen dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

#### **3.4.2 Analisis Kadar Air Metode Oven (AOAC, 2005)**

Prinsip dari analisis kadar air metode oven adalah menguapkan molekul air bebas ( $\text{H}_2\text{O}$ ) yang ada didalam bahan pada suhu dan waktu tertentu, hingga diperoleh kadar air konstan. Adapun tahapan analisis kadar air sebagai berikut :

1. Kurs porselen yang akan digunakan dikeringkan dalam oven selama 24 jam dengan suhu  $100-105^{\circ}\text{C}$
2. Kurs porselen tadi dimasukkan dalam desikator selama 15 menit
3. Kurs porselen ditimbang menggunakan timbangan analitik sebagai berat kurs awal
4. Sampel ditimbang sebanyak  $\pm 2$  gram (C) ke dalam kurs porselen yang telah dikeringkan, dan dicatat sebagai berat sebelum dipanaskan (A)
5. Sampel dikeringkan dalam oven pada suhu  $100-105^{\circ}\text{C}$  selama 6 jam
6. Sampel dimasukkan dalam desikator selama 15 menit
7. Sampel ditimbang kembali sebagai bobot akhir sampel (B)
8. Kadar air sampel dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{A - B}{C} \times 100\%$$

### **3.4.3 Analisis Kandungan Total Fenol Metode Folin-Ciocalteu (Malangngi *et al.* 2012)**

#### **3.4.3.1 Pembuatan Larutan Standar Asam Galat**

1. Dibuat larutan induk 1000 ppm dengan cara menimbang 0,0250 g asam galat dan dilarutkan dengan etanol *p.a* hingga volume 25 ml.
2. Dibuat larutan baku kerja asam galat dengan konsentrasi 200 ppm dengan mengencerkan larutan induk 1000 ppm.
3. Dibuat larutan standar asam galat dari larutan baku kerja 100 ppm dengan deret konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 35 ppm, 40 ppm dan 50 ppm.
4. Ditambahkan 1,5 ml reagen Folin-Ciocalteu
5. Campuran didiamkan selama 5 menit di suhu ruang
6. Ditambahkan 3 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5%
7. Campuran diinkubasi selama 30 menit di suhu ruang
8. Disentrifugasi selama 5 menit
9. Diukur serapannya menggunakan spektrofotometer ultraviolet-visible (UV-VIS) pada panjang gelombang 765 nm.

#### **3.4.3.2 Penetapan Kadar Total Fenolik**

1. Ekstrak diambil sebanyak 0,5 mL (dalam etanol *p.a*) konsentrasi 500 µg/mL
2. Ditambahkan 1,5 ml reagen Folin-Ciocalteu
3. Campuran didiamkan selama 5 menit di suhu ruang
4. Ditambahkan 3 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5%

5. Campuran diinkubasi selama 30 menit di suhu ruang
6. Disentrifugasi selama 5 menit
7. Diukur serapannya menggunakan spektrofotometer ultraviolet-visible (UV-VIS) pada panjang gelombang 765 nm (triplo).

#### **3.4.4 Penetapan Kadar Flavonoid Total (Chang, 2003)**

##### **3.4.4.1 Pembuatan Larutan Standar Kuersetin**

1. Dibuat larutan induk 1000 ppm dengan cara menimbang 0,0250 g kuersetin dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga volume 25 ml.
2. Dibuat larutan baku kerja kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm dengan mengencerkan larutan induk 1000 ppm.
3. Dibuat larutan standar kuersetin dari larutan baku kerja 100 ppm dengan deret konsentrasi 10 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 45 ppm dan 50 ppm.
4. Ditambahkan 1 ml aquades dan 0,5 mL  $\text{NaNO}_3$  5%
5. Campuran diinkubasi selama 6 menit di suhu ruang
6. Ditambahkan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10%
7. Campuran diinkubasi selama 5 menit di suhu ruang
8. Ditambahkan 2,5 mL  $\text{NaOH}$  1 M dan 1,375 mL aquades
9. Diinkubasi selama 15 menit di suhu ruang
10. Diukur serapannya menggunakan spektrofotometer ultraviolet-visible (UV-VIS) pada panjang gelombang 510 nm.

##### **3.5.4.2 Penetapan Kadar Flavonoid Total**

1. Ekstrak diambil sebanyak 0,5 mL (dalam etanol *p.a*) konsentrasi 500  $\mu\text{g/mL}$

2. Ditambahkan 1 ml aquades dan 0,5 mL NaNO<sub>3</sub> 5%
3. Campuran diinkubasi selama 6 menit di suhu ruang
4. Ditambahkan 1 mL AlCl<sub>3</sub> 10%
5. Campuran diinkubasi selama 5 menit di suhu ruang
6. Ditambahkan 2,5 mL NaOH 1 M dan 1,375 mL aquades
7. Diinkubasi selama 15 menit di suhu ruang
8. Diukur serapannya menggunakan spektrofotometer ultraviolet-visible (UV-VIS) pada panjang gelombang 510 nm (triplo).

#### **3.4.5 Analisis Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Yue dan Xu, 2008)**

Adapun tahapan analisis aktivitas antioksidan dengan metode DPPH sebagai berikut :

##### **3.4.5.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,25 mM**

1. Kebutuhan serbuk DPPH dihitung dengan acuan : setiap 1 mg DPPH diencerkan dalam 5 mL etanol 96%
2. Serbuk DPPH dilarutkan dalam etanol 96% (1 mg DPPH + 5 mL etanol)
3. Larutan DPPH disimpan pada kondisi gelap dan tertutup rapat pada kondisi dingin, serta sesegera mungkin untuk digunakan
4. Blanko dibuat dengan cara menambahkan 1 mL larutan DPPH dengan 4 mL etanol dan diukur absorbansinya (harus kurang dari 1) dengan spektrofotometer UV Vis pada  $\lambda = 517 \text{ nm}$



#### 3.4.5.2 Analisis Aktivitas Antioksidan

1. Sebanyak 1 mL ekstrak (dalam etanol *p.a*) 20 µg/ml diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah dibungkus dengan alumunium foil
2. Ditambahkan larutan etanol 96% sebanyak 4 mL
3. Ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,25 mM dan menghomogenkannya dengan vortex
4. Mulut tabung ditutup dengan alumunium foil
5. Sampel disimpan pada kondisi gelap selama 30 menit
6. Panjang gelombang diukur dengan spektrofotometer UV Vis pada  $\lambda = 517$  nm
7. % Inhibisi dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs blanko} - \text{abs sampel}}{\text{Abs blanko}} \times 100\%$$

#### 3.4.6 Analisis Aktivitas Antiinflamasi secara *in vitro* (Anoop dan Bindu, 2015)

Adapun tahapan analisis aktivitas antiinflamasi secara *in vitro* sebagai berikut :

##### 3.4.6.1 Pembuatan Larutan BSA (Bovine Serum Albumin) 1%

1. Sebanyak 1 gram serbuk BSA ditimbang
2. Ditambahkan 100 ml aquades
3. Larutan BSA 1% disimpan pada suhu ruang dan sesegera mungkin untuk digunakan

#### 3.4.6.2 Pembuatan Larutan Buffer Fosfat pH 6,9 ; 0,1 M

1. Sebanyak 1,43 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (268 g/mol) ditimbang
2. Dimasukan ke dalam erlenmeyer
3. Ditambahkan 0,644 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (138 g/mol)
4. Ditambahkan 100 ml aquades dan dihomogenkan
5. Diukur pH menggunakan pH meter.

#### 3.4.6.3 Analisis Aktivitas Antiinflamasi

1. Sebanyak 50  $\mu\text{l}$  ekstrak (dalam etanol *p.a*) 50  $\mu\text{g/ml}$  diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
2. Ditambahkan larutan BSA 1% sebanyak 450  $\mu\text{l}$
3. Diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 20 menit dalam *waterbath*
4. Dipanaskan  $57^\circ\text{C}$  selama 3 menit dalam *waterbath*
5. Didinginkan pada suhu ruang
6. Ditambah 2,5 ml Buffer Fosfat pH 6,9 ; 0,1 M
7. Panjang gelombang diukur dengan spektrofotometer UV Vis pada  $\lambda = 278$  nm
8. % Inhibisi dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs. blanko} - \text{abs. sampel}}{\text{Abs. blanko}} \times 100\%$$

#### 3.4.7 Analisis Statistik

Semua analisis dilakukan secara triplo. Semua hasil ditampilkan sebagai rata-rata  $\pm$  SD. Analisis data dilakukan dengan cara analisa deskriptif dan analisa perbandingan nilai rata-rata melalui uji ANOVA yang dilakukan uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf 5%.